



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Producción de embriones pre implantacionales in vitro
mediante ICSI Y FIV en Vicugna pacos**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista

Biotecnóloga

AUTOR

Patricia Mirelly MAMANI HERRERA

ASESOR

Mg. Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Mamani, P. (2019). *Producción de embriones pre implantacionales in vitro mediante ICSI Y FIV en Vicugna pacos*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



#232

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

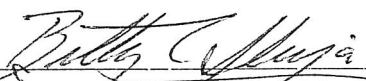
Siendo las *10:10*... horas del 25 de febrero de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga de PATRICIA MIRELLY MAMANI HERRERA.

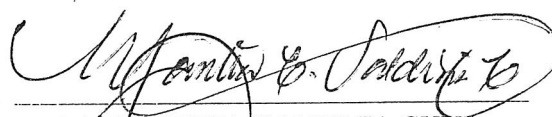
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 022-EPGB-2018, la titulando expuso su tesis: "PRODUCCIÓN DE EMBRIONES PRE IMPLANTACIONALES *IN VITRO* MEDIANTE ICSI Y FIV EN *Vicugna pacos*", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota *19*..., calificativo: *Aprobado con maximos honores*

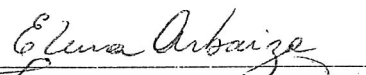
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga a PATRICIA MIRELLY MAMANI HERRERA y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.


Siendo las *11:10*... horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 25 de febrero de 2019.


Blga. BETTY SHIGA OSHIGE
(PRESIDENTA)


Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)


Blga. ELENA ARBAIZA PRADO
(MIEMBRO)


Mg. ZEZE BRAVO GUTIERREZ
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A la segunda fecundación realizada por Daniel y Rossana,

Sin ustedes nada hubiese sido posible.

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento

A mis padres, Rossana y Daniel, por su comprensión y apoyo incondicional a lo largo de todos estos años.

A Blanca, mi hermana, quien siempre tiene una perspectiva diferente.

A mi abuelita, Auria, quien ha sido más que una segunda madre para mí.

A Marco y Lucas, quienes alegran mis días. Los quiero mucho.

A mi profesora Martha Valdivia, por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza y apoyo en el camino de la investigación. Siempre estaré muy agradecida.

A Marcelo Ratto y Ricardo Pella, por su apoyo y mentoría durante el desarrollo de este proyecto.

A Tania, por su Modestia y por siempre ser el Yin cuando yo era el Yang, por su apoyo desde el primer día en este trabajo.

Al Profesor Bravo, Christian, Stefanny, Diego, Maria del Pilar, Cathy y Natalia quienes también me acompañaron y apoyaron siempre que los necesité. Gracias por su colaboración.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción. Gracias por todos los momentos vividos.

A mis mejores amigas Brunela, Jéssica y Rocío, por su amistad y por los gratos momentos compartidos.

Al PROYECTO INNOVATE Convenio 282 INNOVATEPERU-EC-2017 y al Programa de Promoción de Tesis de Pregrado RR N 06369-R-17, Proyecto con código B17100664a

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTO	3
TABLA DE CONTENIDO	4
INDICE DE TABLAS	7
INDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCION.....	15
2. MARCO TEORICO CONCEPTUAL.....	17
2.1 Los camélidos sudamericanos: La Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>).....	17
2.2 Aspectos reproductivos	18
2.3 Situación actual de las biotecnologías reproductivas en alpacas.....	19
2.4 Obtención de ovocitos	21
2.5 Selección de ovocitos.....	21
2.6 Maduración <i>in vitro</i> de ovocitos.....	22
2.6.1 Medios de maduración de ovocitos.....	23
2.7 Métodos de selección de espermatozoides.....	24
2.7.1 Método Swim up	26
2.7.2 Método Percoll	27
2.8 Fecundación <i>in vitro</i>	27
2.8.1 Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	27
2.8.2 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides	28
2.9 Activación.....	29
2.10 Cultivo de embriones.....	30
2.11 Desarrollo embrionario.....	30
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
3.1 Hipótesis	32
3.2 Objetivos	32
3.2.1 Objetivo general	32
3.2.2 Objetivos específicos	32

4	MATERIALES.....	33
4.1	Lugar de estudio	33
4.2	Material biológico.....	33
4.3	Medios de cultivo y reactivos.....	33
4.3.1	Transporte	33
4.3.2	Lavado de las muestras biológicas.....	33
4.3.3	Aislamiento y lavado de los CCO	33
4.3.4	Medio de maduración <i>in vitro</i>	34
4.3.5	Aislamiento y selección espermática	34
4.3.6	Fertilización <i>In Vitro</i>	34
4.3.7	ICSI	34
4.3.8	Activación química	35
4.3.9	Cultivo de embriones	35
4.3.10	Evaluación del estadio nuclear en los ovocitos y embriones	35
4.4	Equipos y materiales de laboratorio.....	35
5	MÉTODOS	36
5.1	Colección y traslado de la muestra.....	36
5.2	Aislamiento y selección de ovocitos	36
5.3	Maduración <i>in vitro</i> de los COCs	37
5.4	Evaluación de la maduración del ovocito	37
5.5	Selección espermática	37
5.6	Fertilización <i>in vitro</i>	38
5.7	Inyección intracitoplasmática	38
5.8	Activación química.....	39
5.9	Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	39
5.10	Valoración del desarrollo embrionario	39
5.11	Análisis estadístico.....	40
6	RESULTADOS	41
6.1.	Producción de embriones mediante FIV.....	41
6.2.	Producción de embriones mediante ICSI.....	41
6.3.	Comparación de embriones obtenidos mediante FIV e ICSI.....	42
6.3.1	Comparación de ovocitos clivados, dos células, mediante FIV e ICSI	44
6.3.2	Comparación de embriones de 4 células mediante FIV e ICSI	45
6.3.3	Comparación de embriones de 8 células mediante FIV e ICSI	45
6.3.4	Comparación de mórulas mediante FIV e ICSI	46
6.3.5	Análisis de embriones por microscopía de fluorescencia	46

7	DISCUSIÓN	48
8	CONCLUSIONES	52
9	RECOMENDACIONES	53
10	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54
11	ANEXOS.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades de los diferentes métodos de separación y selección espermática.....	26
Tabla 2. Embriones producidos mediante FIV	41
Tabla 3. Embriones producidos mediante ICSI.....	41
Tabla 4. Comparación de embriones mediante FIV e ICSI.....	42
Tabla 5. Estadios de desarrollo en FIV e ICSI.....	43
Tabla 6: Recuento de ovocitos clivados, de dos células en adelante, por ambos métodos de fecundación in vitro	44
Tabla 7: Recuento de embriones de 4 células por ambos métodos de fecundación in vitro	45
Tabla 8: Recuento de embriones de 8 células por ambos métodos de fecundación in vitro	45
Tabla 9: Recuento de embriones en estadio de mórula por ambos métodos de fecundación in vitro	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 01: Camélidos en <i>Vicugna pacos</i> , Cusco.....	17
Figura 02: Ovocitos seleccionados para maduración; Clase 1 (Flechas negras) y clase 2 (Flechas azules) Aumento 45X	24
Figura 03: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides	28
Figura 04: Cronología del desarrollo embrionario en la especie bovina	31
Figura 5: Comparación de la producción de embriones mediante FIV e ICSI	43
Figura 6: Estadio de desarrollo embrionario para embriones obtenidos mediante FIV e ICSI ...	44
Figura 7: Análisis de embriones mediante microscopia de fluorescencia utilizando el colorante Hoechst 33342. (A) Ovocito fecundado, tinción de los pronúcleos.(B) Embrión de dos células. (C) Embrión de 4-8 células. (D) Embrión de 8-16 células. (E) Embrión en estadio de mórula.	47
Figura 08: Camal de la ciudad de Huancavelica, Perú	61
Figura 09: Ovarios lavados con agua corriente (Arriba - Izquierda), ovarios en BFS (Arriba - Derecha), aspiración de un folículo (Abajo)	61
Figura 10: Ovocitos maduros, las flechas señalan el 1°cuerpo polar	62
Figura 11: Zona caudal del epidídimo	62
Figura 12: Aspiración de un espermatozoide para ICSI (A), Inyección del ovocito, se muestra el cuerpo polar a las 12 en punto (B), aspiraciones y espiraciones del citoplasma (C).	62
Figura 13. Estadios de desarrollo embrionario a campo claro 250X. Embrión de dos células (A), Embrión de 4 células (B), Embrión de 8 células (C) y mórula (D)	63
Figura 14: Número de ovocitos fertilizados en relación a número de ovocitos maduros y embriones producidos mediante FIV	63

Figura 15: Número de ovocitos fertilizados en relación a número de ovocitos maduros y
embriones producidos mediante ICSI64

ABREVIATURAS

CCO: complejo cumulus - oophorus.

SFB: Suero fetal bovino

CO₂: Dióxido de carbono

FIV: Fertilización *in vitro*

ICSI: Inyección intracitoplasmática del espermatozoide

PHE: Penicilamina-Heparina - Hipotaurina

FSH: hormona folículo estimulante

LH: hormona luteinizante

FCE: factor de crecimiento epidérmico

hCG: gonadotropina coriónica humana

MIV: maduración *in vitro*

O₂: oxígeno

TCM: medio de cultivo de tejidos

BSA: albúmina sérica bovina

ROS: especies reactivas de oxígeno

eCG: gonadotropina coriónica equina

UI: unidades internacionales

msnm: metros sobre el nivel del mar

BFS: buffer fosfato salino

NaCl: cloruro de sodio

rpm: revoluciones por minuto

UNMSM: Universidad Nacional Mayor de San Marcos

PVP: Polyvinylpyrrolidone

RESUMEN

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas en los camélidos sudamericanos, podría acortar el tiempo entre generaciones y, por lo tanto, usarse en programas de mejoramiento genético. En alpacas aun es limitado el número de protocolos de fertilización *in vitro* y más aún de procedimientos como ICSI (Inyección intracitoplasmática del espermatozoide). Por ello, el objetivo general del presente estudio fue producir embriones preimplantacionales de alpaca *in vitro* utilizando el procedimiento ICSI así como la Fertilización *in vitro* convencional. Las muestras biológicas fueron colectadas en el camal municipal de Huancavelica y trasladadas en una solución de NaCl al 0.9% a 4 °C en un plazo de 20 a 22 horas aproximadamente. En el laboratorio, los complejos cumulus - oophorus (CCO) fueron aislados y cultivados a 38.5 °C, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa durante 30 a 36 horas. Se trabajó con espermatozoides aislados de la zona caudal del epidídimo, estos fueron seleccionados por el método de Percoll y Swim up. La fertilización *in vitro* se llevó a cabo con una concentración de 2×10^6 esp/mL en medio HAM suplementado con heparina y PHE (Penicilamina-Heparina - Hipotaurina) como agentes capacitantes durante 18 horas, posteriormente fueron evaluadas y cultivadas en medio de desarrollo KSOM suplementado con SFB, piruvato sódico y gentamicina durante 7 días. Por otro lado, el procedimiento ICSI se realizó en el medio Global Total con Hepes con ayuda del microscopio invertido y sus accesorios para micromanipulación, posteriormente este protocolo fue complementado con una activación química de los ovocitos inyectados que consiste en la incubación en ionomicina 5uM durante 5 minutos seguido de una segunda incubación de 3 horas en 6-DMAP, el cual es necesario para algunas especies según la literatura. Al evaluar los resultados, se obtuvieron 17 embriones mediante FIV y 5 embriones mediante ICSI, es decir 36.9% y 31.3%, respectivamente. Se demostró que es posible la producción de embriones preimplantacionales de alpaca utilizando tanto la técnica de FIV como la de ICSI, pero que el porcentaje de éxito para ambos métodos no presenta diferencia significativa ($p > 0.05$)

PALABRAS CLAVE

Desarrollo embrionario, fecundación, Inyección intracitoplasmática, fertilización *in vitro*, alpaca.

ABSTRACT

The development of reproductive biotechnologies in South American camelids could shorten the time between generations and, therefore, be used in breeding programs. In alpacas, the number of in vitro fertilization protocols is still limited, and even more so in procedures such as ICSI (intracytoplasmic sperm injection). Therefore, the general objective of the present study was to produce alpaca preimplantation embryos in vitro using the ICSI procedure as well as conventional in vitro Fertilization. The biological samples were collected in the municipal slaughterhouse of Huancavelica and transported in a 0.9% NaCl solution at 4 ° C within approximately 20 to 22 hours. In the laboratory, the cumulus - oophorus complexes (CCO) were isolated and cultured at 38.5 ° C, 5% CO₂ and 100% relative humidity for 30 to 36 hours. We worked with sperm isolated from the caudal area of the epididymis, these were selected by the method of Percoll and Swim up. The in vitro fertilization was carried out with a concentration of 2x10⁶ esp / mL in HAM medium supplemented with heparin and PHE (Penicillamine-Heparin-Hipotaurine) as capacitor agents for 18 hours, later they were evaluated and cultured in KSOM development medium supplemented with SFB, sodium pyruvate and gentamicin for 7 days. On the other hand, the ICSI procedure was performed in the Global Total Environment with Hepes with the help of the inverted microscope and its accessories for micromanipulation, later this protocol was complemented with a chemical activation of the injected oocytes that consists in the incubation in 5uM ionomycin for 5 minutes followed by a second incubation of 3 hours in 6-DMAP, which is necessary for some species according to the literature. When evaluating the results, 17 embryos were obtained by IVF and 5 embryos by ICSI, that is, 36.9% and 31.3%, respectively. No significant difference was found between the groups evaluated ($p>0.05$) It was demonstrated that the production of alpaca preimplantation embryos is possible using both the IVF and the ICSI technique, but that the percentage of success for both methods does not present a significant difference ($p> 0.05$).

KEYWORDS

Embryonic development, fertilization, intracytoplasmic injection, *in vitro* fertilization, alpaca.

1. INTRODUCCION

Durante las últimas décadas, la demanda mundial de camélidos sudamericanos se ha incrementado debido principalmente a que son fuente de fibra de alta calidad para la industria textil, fuente alimenticia y sustento económico en zonas altoandinas, además de su valor como mascotas exóticas. Sin embargo, las características inherentes a la fisiología reproductiva de estas especies han hecho dificultosa la aplicación de tecnologías que permitan el desarrollo de sistemas productivos más eficientes (Sansinena *et al.*, 2003), mientras que las deficiencias en estos esquemas de manejo reproductivo han contribuido a un deterioro de la calidad de los animales (Huanca, 2012).

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas en los camélidos sudamericanos, podría acortar el tiempo entre generaciones y, por lo tanto, podría usarse en programas de mejoramiento genético, de esta manera permitiría la propagación de animales con características deseables, especialmente los que poseen fibra fina y de colores naturales (Miragaya *et al.* 2006; Sansinena *et al.*, 2007; Conde *et al.*, 2008).

La técnica de fertilización *in vitro* es una de las tecnologías de mayor desarrollo en los últimos años e involucra el control de los mecanismos de maduración e interacción de los gametos femenino y masculino en un ambiente artificial (Torres, 2017). Sin embargo, a la actualidad los estudios en relación a la aplicación de esta y otras técnicas como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para la producción de embriones en estas especies es aún muy limitada (Pérez *et al.*, 2007), siendo aún necesario el superar muchas deficiencias en la maduración *in vitro*, la fertilización y el cultivo de embriones para estandarizar un protocolo de FIV consistente en estas especies (Ruiz, *et al.*, 2017).

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides, por otro lado, es una importante tecnología de reproducción asistida. Desde el primer informe de ICSI en hámsters la inyección intracitoplasmática de esperma también ha proporcionado una herramienta valiosa en el

estudio del control del ciclo celular, los mecanismos subyacentes a la activación de ovocitos inducidos por espermatozoides y la necesidad de una mayor activación química después de ICSI (Sansinena, *et al.*, 2007).

El objetivo general del presente estudio fue producir embriones pre implantacionales de alpaca *in vitro* utilizando el procedimiento ICSI, así como la Fertilización *in vitro* convencional.

2. MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1 Los camélidos sudamericanos: La Alpaca (*Vicugna pacos*)

Los camélidos pertenecen taxonómicamente al orden Artiodactyla, suborden Tylopoda y familia Camelidae. La alpaca es una de las cuatro especies de camélidos sudamericanos o del nuevo mundo; que abarcan los géneros *Lama* y *Vicugna*. El género *Camelus* nombra a los camélidos del viejo mundo. El guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) constituyen las especies silvestres, mientras que la alpaca (*Vicugna pacos*) y llama (*Lama glama*) son especies domesticadas.



Figura 01: Camélidos en Vinicunca, Cusco
(Fotografía: Patricia M. Mamani)

La población de alpacas se estima en más de 4 millones y 87% de estos ejemplares se encuentran en las zonas alto andinas del Perú. La población de alpacas se ha incrementado en más de la mitad al 2017. Puno y Cusco albergan la mayor cantidad con 1.45 millones y 545,454 de alpacas, respectivamente (Figura 01). Seguidos de Arequipa (468,392 ejemplares), Huancavelica (308,586), y Ayacucho (230,910), entre otras regiones. (CENAGRO, I., 2012)

La crianza de camélidos en el Perú es una actividad económica muy importante en el sector agropecuario, pues soporta climas frígido y altitudes que oscilan entre los 3800 a 5000 m.s.n.m además de pastos naturales adaptados a la ecología alto andina. Es aquí que la alpaca cumple un rol importante desde el punto de vista social, económico y ecológico. Miles de familias tienen

como única fuente de ingreso y sustento los productos que se derivan de estos camélidos, como: la fibra, la carne, las pieles y cueros, etc. (Solís *et al.*, R. 1997).

Los bajos índices productivos ligados al deficiente manejo de los animales representa una de las mayores debilidades en la crianza, lo que se traduce en escasos ingresos económicos siendo la venta de la fibra la de mayor demanda debido a sus características textiles muy particulares como, finura, brillo, suavidad, diversidad de colores, etc. (Gallegos y Villalta *et al.*, 2010). Por ello se necesita una mejora genética que contribuya a esta actividad en muchos aspectos, tanto en finura de fibra, uso de nuevas técnicas de manejo de pastos, la selección de los mejores animales para fines reproductivos, entre otros (Quispe *et al.*, 2005)

Las malas prácticas en la crianza tradicional dentro de los últimos siglos han disminuido la calidad genética de estos animales, así como su diversidad, siendo solo el 8% de alpacas, las que presentan una finura de 22 micras aceptable por la industria (Freyre *et al.*, 2006). Estudios indican que las alpacas de color presentan una mayor rusticidad a diferencia de las de vellón blanco, convirtiéndolas en un recurso genético valioso como reserva de genes para programas de mejora genética y desarrollo frente al cambio climático (Vallejo *et al.*, 2012). La falta de asistencia técnica causa una disminución de estas alpacas y por otro lado la consanguinidad origina defectos genéticos relacionados a problemas reproductivos que afectan directamente al poblador alto andino y su economía (Sumar *et al.*, 1989)

2.2 Aspectos reproductivos

Las alpacas poseen características reproductivas fisiológicas particulares como, por ejemplo, las hembras son de ovulación inducida dependiendo del estímulo coital pero el crecimiento folicular se produce en ondas (Vaughan *et al.*, 2004), la ovulación ocurre por igual en ambos ovarios; sin embargo, el embrión se implanta en el cuerpo uterino izquierdo en el 95-98% de las veces (Fernández-Baca *et al.*, 1973; Bravo y Varela *et al.*, 1993). En ausencia de los machos, las hembras muestran ondas foliculares anovulatorias sucesivas hasta que se presente el estímulo

para la ovulación (Adams *et al.*, 1990; citado por López, 2014). En el ámbito masculino la pubertad o tiempo para alcanzar la madurez sexual es variable, la desaceleración del crecimiento testicular, la alta incidencia de anomalías testiculares y baja concentración de espermatozoides causa una pobre fertilidad en contraste con otras especies domésticas. Estas características, afectadas por factores genéticos, nutrición, cambios climáticos, etc. son puntos a investigar respecto a la mejora en el ámbito reproductivo de la especie.

2.3 Situación actual de las biotecnologías reproductivas en alpacas

Las herramientas biotecnológicas pueden contribuir rápidamente a superar diversos problemas en el ámbito reproductivo mediante técnicas que permitan elevar los bajos índices de fertilidad y así obtener un mayor número de animales de alto valor formando núcleos genéticos que cumplan un rol como reproductores.

El desarrollo de tecnologías reproductivas como la Inseminación Artificial, Transferencia de embriones, Fecundación *In vitro*, etc. se presentan como importantes alternativas para contribuir a mejorar la calidad genética en un menor tiempo y por ende a mejorar los ingresos de los pobladores de las zonas andinas (ILLPA-INIA; 2007)

La producción de embriones *In vitro* consta de varias etapas, cada una de las cuales puede afectar a los resultados finales y su calidad. Estas etapas son las siguientes: obtención de ovocitos, selección de los ovocitos, maduración *In vitro* (MIV), obtención de espermatozoides, fecundación *In vitro* (FIV) y cultivo de cigotos.

Las técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial, en camélidos no son masivas como en otras especies, puesto que la colección del semen es complicada por la duración de la copula y la deposición del semen en el útero (Bravo *et al.*, 2000 y Bravo *et al.*, 2013)

Por otro lado, la fecundación *in vitro* representa una alternativa para lograr propagar animales genéticamente superiores desde el punto de vista productivo, especialmente aquellos que

posean fibra fina y colores naturales en el pelaje (Miragaya *et al.*, 2006), y también para la preservación de los especímenes silvestres (Ruiz, 2011; citado por Torres, 2017).

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es una importante tecnología reproductiva, particularmente en casos de infertilidad masculina. Desde los primeros reportes en hámster (Uehara y Yanagimachi, 1976), ratones (Kimura y Yanagimachi, 1995), conejos (Hosoi *et al.*, 1998), ovejas (Catt *et al.*, 1996), ganado vacuno (Hamano *et al.*, 1999), caballo (Cochran *et al.*, 1998), felinos domésticos (Gomez *et al.*, 2000), cerdo (Martin, 2000; Kolbe y Holtz, 2000; Lai *et al.*, 2001) y humanos (Palermo *et al.*, 1992; Tesarik *et al.*, 1996) se ha visto su aplicación mediante técnicas de micromanipulación. También se ha utilizado esta herramienta para estudiar el control del ciclo celular y el papel de los espermatozoides en la activación del ovocito, así como una activación química adicional después del ICSI. En algunas especies como hámster, ratón y humano, la activación mecánica causada por la técnica *per se* es suficiente para liderar la cascada que activa el ovocito (Kimura and Yanagimachi *et al.*, 1995; Kuretake *et al.*, 1996; Perreault *et al.*, 1988; Tesarik y Sousa *et al.*, 1995), en contraste con otras especies como la vaca (Rho *et al.*, 1998) y el cerdo (Lee *et al.*, 2003), las que requieren una activación adicional seguido a la inyección del esperma.

La investigación en este ámbito representa un punto de partida no solo para la producción de embriones, sino aplicable también con otros fines como la clonación, producción de animales transgénicos e investigación en células madre (Kakkassery *et al.*, 2010).

Sin embargo, pese al incremento de reportes en relación al estudio y la aplicación de estas tecnologías en esta especie, su validación y aplicación comercial permanecen aún desconocidos, existiendo muchas deficiencias en las técnicas aplicadas en alpaca y especies afines (Brown, 2000; Morton *et al.*, 2007; Leisinger *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2017).

2.4 Obtención de ovocitos

Una manera de obtener ovocitos es a partir de animales vivos, mediante una aspiración transvaginal ecoguiada (OPU). Aunque también es común la aspiración de los folículos con un diámetro comprendido entre 3 y 6 mm directamente de la superficie de los ovarios de hembras sacrificadas en el matadero, para lo cual se emplean jeringas y agujas del número 18G al 21G (Chuquitaype *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2017).

Por otro lado, al realizarse cortes superficiales por medio del uso de un bisturí sobre ovario, se libera el contenido de los folículos y se recuperan también los llamados complejos cumulus-oophorus o CCO. Muchos trabajos han reportado buen rendimiento para de esta técnica en la recuperación de los CCO en comparación con la aspiración o la punción de folículos (Pawshe *et al.*, 1994; Shirazi *et al.*, 2005; Mehmood, *et al.*, 2011; Chuquitaype *et al.*, 2015, Turpo *et al.*, 2015).

2.5 Selección de ovocitos

Para la selección de los ovocitos se debe tener en cuenta diversos criterios como el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea. El diámetro o tamaño de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar (Sato *et al.*, 1990; Fair *et al.*, 1995), los ovocitos rodeados por varias capas de células del cúmulo compacto presentan mayores porcentajes de maduración, fecundación y de desarrollo hasta blastocistos, en comparación de los que carecen de cúmulo o poseen solamente pocas capas (Xu *et al.*, 1986; Lonergan *et al.*, 1994; Momozawa y Fukuda *et al.*, 1995; Stojkovic *et al.*, 2001). Muchos autores han reportado una relación entre el aspecto del citoplasma y la competencia del ovocito para madurar y su posterior desarrollo (Younis *et al.*, 1989; Momozawa y Fukuda, 1995; Nagano *et al.*, 1999). Mientras que los que muestran un citoplasma pálido tienen una baja densidad de orgánulos y escaso potencial de desarrollo.

La morfología de los complejos cumulus- oophoros son indicadores de lo que se espera tras la maduración *in vitro* de ovocitos. Siendo los que posean de tres a más capas de células del cumulus, tamaño del citoplasma idóneo y homogeneidad del mismo, las características deseables y necesarias para una adecuada clasificación y selección de los CCO antes al inicio del cultivo (Kakkassery, *et al.*, 2010).

En general podemos clasificar a los complejos cumulus-oophorus en 4 categorías:

Clase 1: CCO con más de 5 capas completas de células del cumulus que rodean al ovocito y cuyo citoplasma es oscuro homogéneo.

Clase 2: CCO con menos de 5 capas de células del cumulus completas y con citoplasma del ovocito oscuro homogéneo.

Clase 3: CCO con capas de células del cumulus presentes, pero menos compactas y citoplasma del ovocito no homogéneo

Clase 4: Ovocito con citoplasma heterogéneo o fragmentado y con las células del cumulus disgregadas o ausentes en su totalidad. (Sánchez *et al.*, 2003, citado por Torres, 2017)

Los ovocitos de categorías 1 y 2 son los utilizados pues son los que poseen un elevado potencial para desarrollarse hasta embriones por fertilización *in vitro* en comparación con muestras pertenecientes a las categorías 3 y 4 (Lonergan *et al.*, 1991, citado por Torres, 2017). (Figura 02)

2.6 Maduración *in vitro* de ovocitos

La maduración ovocitaria es una etapa decisiva del proceso de producción de embriones *in vitro*. Pues existen evidencias que los ovocitos madurados *in vivo* poseen una competencia superior frente a los madurados *in vitro* (Dieleman *et al.*, 2002). Si las condiciones de maduración son muy desfavorables, se observa el bloqueo de la meiosis truncando cualquier posterior desarrollo mientras que, si estas condiciones tienen pequeñas fallas, las consecuencias podrían ser cambios epigénéticos en el genoma embrionario (Niemann y Wrenzycki, 2000) y en la expresión génica (Rinaudo y Schultz 2004).

La maduración *in vitro* (MIV) es una técnica que utiliza los ovocitos inmaduros removidos de los folículos para ser cultivados en medios que simulan las condiciones fisiológicas necesarias para que alcancen el estadio de metafase II es decir maduren y puedan llevar a cabo las funciones necesarias para la fecundación y posterior desarrollo embrionario (Herrera *et al.*, 2009; Yang & Chian *et al.*, 2017).

2.6.1 Medios de maduración de ovocitos

Los medios de maduración más utilizados son el Ham's F-10, Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1, que poseen en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato sódico, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador del pH. Siendo el TCM 199 el medio más utilizado, compuesto por sales de Earl's con HEPES y bicarbonato como estabilizante del pH (Chuquitaype *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2017), y el que presenta los mejores resultados. Es así que la composición de estos medios es un factor que puede limitar la eficiencia de la tecnología reproductiva, pues una maduración incompleta tanto a nivel de citoplasmática como el nuclear se asocia a bajas tasas de producción de embriones. (Oberlender, *et al.*, 2013).

La suplementación de estos medios con antibióticos se realiza con la finalidad de evitar la contaminación de las muestras que muchas veces es obtenida de los camales o centros de beneficio (Chuquitaype *et al.*, 2015). Las fuentes proteicas más empleadas dentro de los medios de cultivo son la albúmina sérica bovina (BSA) y el suero fetal bovino (SFB), las cuales sirven como fuente de nitrógeno y agente quelante de iones tóxicos y antioxidantes dentro del medio de cultivo (Jee, *et al.*, 2008).

La importancia *in vivo* de las hormonas como la FSH y la LH en el proceso de maduración promueve su uso rutinario como suplemento de los medios *in vitro* (Torres *et al.*, 2017). Los factores de crecimiento como el epidérmico (FCE) estimula significativamente la expansión de las células cumulus (Downs *et al.*, 1989, citado por Daen *et al.*, 1994).

Mientras que los niveles de oxígeno en los folículos ováricos, el oviducto y el útero oscilan entre el 1,5 y el 8 % (Harvey *et al.*, 2007), muchos procesos se realizan bajo una atmósfera con un contenido en oxígeno del 20%, lo cual produciría un alto nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) causando una menor calidad y potencial de desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* en comparación con los madurados *in vivo* (Zhao *et al.*, 2018)

Los agentes antioxidantes comúnmente utilizados son, por ejemplo, a-tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) y melatonina entre otros (Dalvit, *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2018).



Figura 02: Ovocitos seleccionados para maduración; Clase 1 (Flechas negras) y clase 2 (Flechas azules) Aumento 45X

2.7 Métodos de selección de espermatozoides

El tracto reproductor de la hembra se considera como un órgano de doble filtración, pues separa los espermatozoides del plasma seminal y también provee de barreras para evitar el paso de espermatozoides anormales (Taylor *et al.*, 2008). En estudios de especies que presentan baja tasa de preñez, es incierto si la causa de esta infertilidad es la eliminación de un gran número de espermatozoides y su disminución para que ocurra la fertilización, o en su defecto, debido al

mayor número de espermatozoides anormales, el ovocito al ser fecundado por uno de ellos falla en su desarrollo a cigoto (Morrell *et al.*, 2009).

Con la aplicación de biotecnologías de reproducción asistida, la selección de espermatozoides ha pasado a ser un procedimiento muy importante para obtener buenos resultados. Estas técnicas no solo remueven el plasma seminal y los crioprotectores, de ser usada una muestra congelada, sino que también es deseable obtener muestras con una movilidad rectilínea progresiva mínima (Urrego *et al.*, 2008).

Con el desarrollo de la fecundación *in vitro* y otras biotecnologías en el ámbito reproductivo, la selección de espermatozoides ha comenzado a ser un importante procedimiento para obtener resultados óptimos. Existen varios reportes científicos que indican las bondades de las técnicas de selección espermática (Tabla 1) utilizados para a la inseminación artificial (IA), fecundación *in vitro* (FIV) y/o inyección intra-citoplasmática de espermatozoide (ICSI) tanto en humanos y animales (Morrell y Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009).

Tabla 1: Propiedades de los diferentes métodos de separación y selección espermática.

	MIGRACIÓN (SWIM UP)	CENTRIFUGACIÓN COLOIDE (PERCOLL)
FACILIDAD EN USO	Simple	Requiere atención para detalles
EQUIPOS REQUERIDOS	Tubo especial	Centrífuga
COSTO POR MUESTRA	Bajo	Alto
SELECCIÓN ESPERMÁTICA	Basado solo en motilidad	Basado en motilidad morfología y viabilidad, calidad de cromatina
REMOCIÓN DE PLASMA SEMINAL	Si	Si
REMOCIÓN DE PATÓGENOS	No hay datos	Si
RESTOS CELULARES	Ausente	Ausente
MOTILIDAD ESPERMÁTICA	10 a 20%	Mas de 50%
REMOCIÓN DE LEUCOCITOS	Si	Si
INTEGRIDAD DE CROMATINA	Pobre	Buena

FUENTE: Morrell y Rodriguez-Martinez (2009).

2.7.1 Método Swim up

La selección de espermatozoides mediante esta técnica está basada en su movilidad intrínseca; desarrollada por primera vez por Parrish *et al.*, (1984), la muestra se deposita en el fondo de un tubo de ensayo con un medio adecuado y se incuba por un periodo de 60 minutos con una inclinación de 45°. Los espermatozoides con la mejor movilidad serán capaces de nadar hacia la superficie del medio, de tal manera que al retirar la capa superior de medio se estarán seleccionando los espermatozoides vivos y con movilidad progresiva en su mayoría. (Parrish *et al.*, 1995; Dode *et al.*, 2002 y Kochhar *et al.*, 2003). La metodología ha sufrido una serie de cambios con el fin de mejorar su eficiencia. Los espermatozoides que se obtienen son de buena calidad en el ámbito motil, pero su rendimiento cuantitativo suele ser bajo siendo la tasa de recuperación, por ejemplo, 10-20% (Hallap *et al.*, 2004), lo cual constituye una desventaja pues se necesitaría una mayor cantidad de muestra para este tratamiento (Palma, 2001).

Adicionalmente; la morfología normal de la cabeza, la integridad de la cromatina, o la viabilidad e integridad acrosomal (Somfai *et al.*, 2002) no son tomadas en cuenta en la selección mediante esta técnica.

2.7.2 Método Percoll

Esta técnica se basa en la velocidad y la relativa alta densidad de los espermatozoides. La solución espermática diluida en un medio capacitante, es colocada en la parte superior de una columna de *percoll*® previamente armada, la cual está constituida de dos fases con concentraciones diferenciales de 45 y 90% en la parte superior e inferior respectivamente. Finalmente, después de centrifugar el tubo, los espermatozoides viables quedan concentrados en el fondo mientras que los muertos o de baja movilidad, el plasma seminal y demás partículas no logran atravesar y se quedan atrapados en las fases del gradiente (Dode *et al.*, 2002; Kochhar *et al.*, 2003; Parrish *et al.*, 1995). El uso de este protocolo para la preparación espermática previo a la fertilización no presenta efectos deletéreos sobre la membrana plasmática y sobre el ADN (Ángel *et al.*, 2009).

2.8 Fecundación *in vitro*

2.8.1 Fertilización *in vitro* (FIV)

Esta técnica de reproducción asistida consiste básicamente en tres etapas con objetivos específicos: a) Recuperación de ovocitos, b) Inseminación, fertilización y cultivo de los embriones, c) Transferencia de embriones.

Los ovocitos recuperados son aislados y clasificados: Maduros, inmaduros, atrésicos o con la zona fracturada. Siendo estos dos últimos no aptos para la fertilización. Los ovocitos son puestos a un cultivo para completar su maduración hasta observar la expulsión del segundo cuerpo polar. Una vez lograda la maduración, se ponen en contacto ambos gametos en un medio de cultivo óptimo para la fecundación durante 18- 24 horas, periodo en el cual comienza su clivaje.

Posteriormente, se comprueba la fertilización por observación directa. Cuando los embriones se han desarrollado, el objetivo es transferirlos al útero de la hembra utilizando una cánula de plástico que ingresa por el cuello del útero para depositar los embriones en el útero.

2.8.2 Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

En este método, los pasos a seguir son idénticos al de FIV, excepto por la fertilización de los óvulos *in vitro*. La técnica selecciona un espermatozoide para cada óvulo utilizando un microscopio invertido con accesorios micromanipuladores; es decir, agujas especiales para la introducción del espermatozoide al citoplasma de un óvulo maduro. Los casos en los que se emplea esta técnica de alta complejidad son aquellos en los que el número de espermatozoides es bajo, hay una deficiente morfología y movilidad de los gametos masculinos, inhabilidad del espermatozoide para penetrar el ovocito, etc. Además, esta técnica puede ser también aplicada para preservar la biodiversidad y producir animales transgénicos, para lo cual se requieren algunas modificaciones respecto al protocolo tradicional con el objetivo de incrementar la tasa de éxito. Es considerada ser más eficiente que FIV e IA debido a que para ICSI solo un espermatozoide intacto es suficiente para fertilizar un ovocito mientras que para las otras técnicas se requieren generalmente millones. (Parmar, 2013)



Figura 03: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

2.9 Activación

Después de ser fecundado, el óvulo sufre una serie de cambios químicos causando la liberación de calcio en su interior producto del ingreso del espermatozoide. Llevándose a cabo los siguientes eventos: reacción cortical que impide el ingreso de otro espermatozoide, activación del metabolismo del óvulo, reactivación de la meiosis que concluirá con la aparición de dos pronúcleos: uno de origen materno y otro de origen paterno. Varias teorías respecto al mecanismo por el cual el espermatozoide induce la activación en el ovocito se han planteado. (Tosti & Ménéz *et al.*, 2010) Siendo la más aceptada aquella que involucra el rol de la proteína fosfolipasa C- zeta (PLC ζ) (Kashir, Nomikos, Lai, & Swann, 2014; Swann & Lai, 2016) Después de la interacción con la zona pelúcida, en mamíferos, el espermatozoide libera PLC ζ , causando una corriente de iones hacia el exterior debido a la modificación eléctrica de la membrana plasmática del ovocitos, se incrementa el calcio intracelular y se generan oscilaciones de este ion. La presencia de picos de zinc también se ha implicado en la regulación del ciclo meiótico de ovocitos de mamíferos (Que *et al.*, 2015).

Naturalmente, el espermatozoide desencadena este proceso mientras que las causas detrás del fallo no siempre se conocen y no pueden ser solucionados. Posibles causas pueden ser la calidad del ovocito (anomalías morfológicas), maduración citoplasmática del óvulo o por no ser capaz de reconocer al espermatozoide. Una solución propuesta es la activación artificial del ovocito, proceso posterior a la micro inyección en el que el ovocito es expuesto a una solución de ionóforo en una o dos ocasiones. La estandarización de este proceso es incierta, teniendo variables como la concentración, tiempo de exposición y modo de aplicación del ionoforo en diferentes referencias. Algunos estudios en alpaca han reportado un incremento de 29% a 63% (Sansinema *et al.*, 2007), así como también en camellos. (Wani *et al.*, 2018)

2.10 Cultivo de embriones

El cultivo embrionario es una de las fases más importantes de la fecundación *in vitro* pues sus condiciones influyen directamente a la calidad de los embriones. Por ello, se deben mantener las condiciones controladas en todo momento, tanto temperatura, concentración de gases, humedad, así como pureza del aire, luz, etc. Pues estos componentes influyen significativamente el desarrollo embrionario, propiciando una menor calidad en comparación con los embriones producidos *in vivo* (Mucci *et al.*, 2006).

Para camélidos del nuevo continente (llamas y alpacas) se ha encontrado que los valores utilizados para temperatura oscilan entre los 38° y 38.5°C bajo una atmosfera con 5% de CO₂ y 90% de N₂ en el aire (Wani *et al.*, 2017) y los controles se realizan los días 1, 3, 5 y 7 post fecundación.

2.11 Desarrollo embrionario

En mamíferos, la segmentación es holoblástica rotacional. Es una de las más lentas del reino animal con cerca de 12 a 24 horas de separación entre clivajes. Una característica distintiva son las orientaciones entre sí de los clivajes de sus blastómeras. La primera, es una división meridional normal, posteriormente una de los dos blastómeros formados se divide meridionalmente mientras que el otro se divide ecuatorialmente, por ello el nombre de “segmentación rotacional”. La asincronía es una característica propia de la segmentación en mamíferos, no se dividen todas al mismo tiempo y se encuentran blastómeros impares. (Gulyas, 1975)

Alcanzadas las 24 horas, se observan embriones de 2 células; a las 72 horas alcanzan el estadio de 8 - 16 células, en el día 5 se observan mórulas y finalmente en el día 7, blastocistos. En el estadio de 8 células no se observan unidos o compactados los blastómeros, pero a partir de las siguientes divisiones los blastómeros se aproximan formando uniones estrechas capaces de

intercambiar gases, a este estado se le llama “mórula”. Seguidamente, se forma una cavidad en el interior llamada blastocelo causada por la secreción de un fluido hacia el interior de la mórula, diferenciándose en dos zonas: trofoblasto o trofotodermo que da lugar al corión y la masa celular interna que da origen al embrión en sí. (Figura 04)

De acuerdo a un estudio en el 2003, al día 15 después de la copulación, el blastocisto esta libre en el útero y puede atravesar los cuernos para implantarse llegado el día 20 (Olivera, 2003).

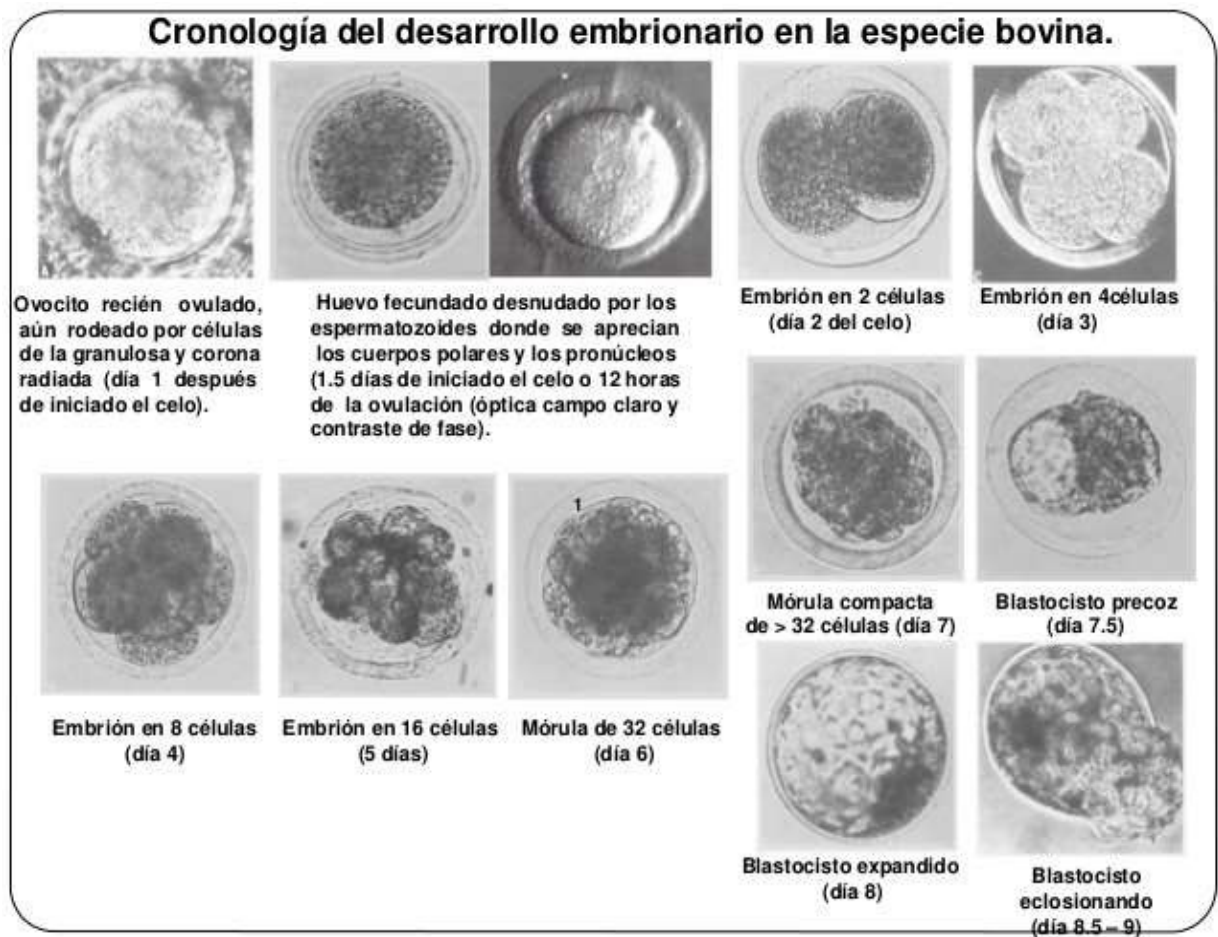


Figura 04: Cronología del desarrollo embrionario en la especie bovina

De Armas et al, 2014

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

H0: No existe diferencia entre el porcentaje de embriones obtenidos mediante ICSI con los producidos mediante Fertilización *in vitro* (FIV)

H1: Existe diferencia entre el porcentaje de embriones obtenidos mediante ICSI con los producidos mediante Fertilización *in vitro* (FIV)

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

- ✓ Producir embriones preimplantacionales *in vitro* mediante ICSI y FIV en alpaca *Vicugna pacos*.

3.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Comparar los embriones obtenidos mediante Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) y Fecundación *In Vitro* (FIV) en *Vicugna pacos*.
- ✓ Evaluar la Fertilización *in vitro* en el grupo de ovocitos obtenidos mediante aspiración y cortes de folículos ováricos.
- ✓ Determinar la importancia de la activación química de ovocitos inyectados (ICSI) en el desarrollo embrionario de *Vicugna pacos*.

4 MATERIALES

4.1 Lugar de estudio

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, durante los meses de abril a diciembre del año 2018

4.2 Material biológico

Los ovarios y testículos empleados para el presente trabajo fueron obtenidos del camal municipal de la ciudad de Huancavelica, región Huancavelica, Perú (4050 msnm, temperatura promedio anual 8 °C – 10 °C), utilizándose un total de 22 epidídimos y 389 ovarios; ningún animal recibió tratamiento hormonal antes de su beneficio.

4.3 Medios de cultivo y reactivos

4.3.1 Transporte

Para el transporte de los ovarios y testículos se empleó una solución salina al 0.9% a 4 °C de temperatura mediante el uso de gel-packs y una caja termo-aislante.

4.3.2 Lavado de las muestras biológicas

Agua corriente, BFS suplementado con antibióticos: Cloruro de sodio (Sigma S5886), cloruro de potasio (P9333 Sigma), fosfato de potasio (P5379 Sigma) y fosfato dibásico de sodio (Sigma S5136), suplementado con penicilina sódica (P3032 Sigma) y estreptomicina (S1277 Sigma).

4.3.3 Aislamiento y lavado de los CCO

Para el aislamiento, lavado y selección de los CCO morfológicamente normales (clases I y II) se empleó una solución Dulbecco (D5773 Sigma) suplementada con cloruro de calcio (C1016 Sigma), penicilina sódica (P3032 Sigma), estreptomicina (S1277 Sigma) y heparina sódica (laboratorio Sanderson 5000UI/mL).

4.3.4 Medio de maduración *in vitro*

El medio de maduración tuvo como base el medio 199 (M2520 Sigma), diluido en agua ultra pura de calidad Milli-Q® y suplementado FSH 1.5uL/mL (Folltropin-V), eCG 10UI/mL (Novormon), estradiol 17 β 0.1 μ L/mL (E4389 Sigma), piruvato de sodio 0.2mM (P5280 Sigma), factor de crecimiento epidérmico 50ng/mL (EGF) (E9644 Sigma), albúmina bovina sérica fracción V 4mg/mL (BSA) (A3311 Sigma), gentamicina 50 μ g/mL (G3632 Sigma) y suero fetal bovino al 10% (SFB) (F4135 Sigma)

4.3.5 Aislamiento y selección espermática

Para el manejo y selección de los espermatozoides se empleó el medio HAM F-10 (N6635 Sigma), suplementado con lactato de calcio (L4388 Sigma), bicarbonato de sodio (S5761 Sigma), penicilina, estreptomycin y albúmina bovina sérica fracción V (BSA) (A3311 Sigma). Así como columnas de Percoll, suplementado con Lactato de sodio, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio (S5761 Sigma).

4.3.6 Fertilización *In Vitro*

Para la fertilización *in vitro* se utilizó el medio Ham-F10 (N6635 Sigma), suplementado con PHE (penicilamina (P4875 Sigma), hipotaurina (1384 Sigma) y epinefrina (E4250 Sigma), heparina y albúmina bovina sérica fracción V (BSA) (A3311 Sigma)

4.3.7 ICSI

El medio utilizado para este procedimiento fue Global total con Hepes (LGTH), PVP (FertiPro PVP 0.2S) para inmovilizar los espermatozoides y Dimetil polixiloxane (DMPSV) para facilitar el uso de las agujas en la inyección.

4.3.8 Activación química

Este tratamiento complementario se realizó mediante incubaciones en el medio 199 (M2520 Sigma) y el medio KSOM+ aa (Merck MR-106-D); utilizando ionomicina (I0634) y 6-DMAP (D2629) como activadores.

4.3.9 Cultivo de embriones

Finalmente, para el cultivo de embriones se utilizó el medio KSOM+ aa (Merck MR-106-D) suplementado con SFB (F4135 Sigma), piruvato de sodio (P5280 Sigma) y gentamicina (G3632 Sigma). Todos los medios de cultivo fueron filtrados mediante el uso de filtros de membrana de 0.22 μ m (Millex-GV Merck) y cubiertos con aceite mineral (LifeGuard Oil).

4.3.10 Evaluación del estado nuclear en los ovocitos y embriones

Colorante vital Hoechst 33342 (14533 Sigma) y solución BFS.

4.4 Equipos y materiales de laboratorio

Incubadora de CO₂, cámara de flujo laminar, balanza analítica, centrífuga, microscopio de luz, estereoscopio, microscopio invertido con accesorios para micromanipulación Narishigue, agujas Holding, agujas ICSI, microscopio de fluorescencia (marca AJ 43 Seitz), plancha termo-controlada, estufa, autoclave, sistema de purificación de agua, refrigeradora y micropipetas. Pipetas Pasteur de vidrio, bulbos de goma para pipetas, pipetas pasteur de plástico, tips, tubos de centrífuga de 1.5, 0.6 y 0.2mL, tubos Falcon de 15mL y 50mL, filtros de membrana de 0.22 μ m, placas Petri de vidrio, placas de cultivo Falcon para ICSI (351006), Placas Corning™ (353001), Placa de cultivo Falcon 60 x 15 mm (353652), pinzas hemostáticas, tijeras, coladores, vasos precipitados, jeringas de 1 y 10mL, agujas 21G, hojas de bisturí, cajas de Tecnopor, gel-packs, láminas y laminillas

5 MÉTODOS

5.1 Colección y traslado de la muestra

Las muestras biológicas, testículos y ovarios, fueron colectadas en el camal de la ciudad de Huancavelica, Perú (4050 msnm, temperatura promedio anual 8 °C – 10 °C) (Figura 08), y fueron transportadas a 4°C en una solución de NaCl 0.9% por aproximadamente 24 horas al Laboratorio de Fisiología de la Reproducción (LFR) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM (Lima, 100 msnm, temperatura 15 °C – 27 °C)

5.2 Aislamiento y selección de ovocitos

Los ovarios fueron lavados dos veces con agua corriente, seguido por lavados con una solución salina tamponada con fosfato o buffer fosfato salino (BFS) más penicilina 0.075g/L y estreptomicina 0.075g/L a 38.5°C.

El aislamiento de ovocitos fue realizado mediante dos técnicas: aspiración y cortes. La aspiración de los folículos de 2 mm o más con ayuda de una aguja N° 21 y Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, el fluido recuperado fue colocado en tubos de centrifuga de 15 mL y dejado sedimentar por 10 minutos. El pellet fue recuperado con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico y los CCOs seleccionados fueron aislados bajo el estereoscopio mediante la clasificación como indica De Loos et al., (1989). Los cortes realizados sobre la superficie de los ovarios después de la aspiración se realizaron sobre placas Petri pequeñas que contenían solución Dulbecco a 38.5 °C, de tal manera que al revisar la solución de estas placas se pudieron aislar y seleccionar CCOs viables para la maduración. Se clasificaron como viables para ser fecundados los pertenecientes a la clase I y II (Sánchez *et al.*, 2003)

5.3 Maduración *in vitro* de los COCs

El medio de maduración empleado fue preparado menos de 12 horas antes de ser usado y se colocó en gotas de 25 µl en placas Petri de 35 x 15 mm cubiertos con aceite mineral con la finalidad de equilibrar la temperatura y pH de las gotas.

Los COCs previamente seleccionados fueron lavados dos veces en medio de maduración para ser colocados aleatoriamente en grupos de 10 ovocitos por gota en las placas Petri, estos fueron incubados por 31 - 36 horas a 38.5°C, 5% de CO₂ y alta humedad (Ratto, 2005; Marques, 2007; Leisinger, 2014).

5.4 Evaluación de la maduración del ovocito

Se observaron los ovocitos y el estado de las células del cumulus, siendo las expandidas (aquellas con células del cumulo parcial o totalmente desprendidas de la superficie de la zona pelúcida) objeto de observación. Si aun mantenían adheridas células del cumulus a la superficie del ovocito, estas fueron desprendidas mecánicamente (denudación) mediante aspiraciones y espiraciones suaves por medio de una pipeta Pasteur. Finalmente, la maduración de los ovocitos se evaluó por la constatación de la presencia del 1° cuerpo polar observado bajo el microscopio de luz invertido. (Figura 10)

5.5 Selección espermática

Los testículos fueron lavados con PBS (Phosphate - buffered saline) suplementado con penicilina 0.075g/L y estreptomicina 0.075g/L. La zona caudal de los epidídimos fue separada de cada testículo con ayuda de una tijera y pinza hasta quedar libre de exceso de tejidos y restos (Figura 11). Se seleccionaron los espermatozoides mediante la técnica del *swim up*. Los epidídimos aislados fueron cortando en pequeñas porciones (slicing), los que se suspendieron en 500 µl de medio HAM para lavado de espermatozoides suplementado con BSA 4mg/mL y se dejó reposar 5 minutos a 38.5°C. Inmediatamente, este volumen fue recuperado en un tubo de centrifuga de

1.5mL y centrifugada a 1600 rpm x 6 minutos a 38.5 °C. Se descartó el sobrenadante y al pellet formado al fondo del microtubo se le adicionó 200ul de solución capacitante, medio HAM suplementado con BSA 15mg/mL, la cual se dejó en incubación a 45° de inclinación durante 60 minutos en una cámara de CO₂, con la finalidad de obtener espermatozoides motiles en la parte superior de la mezcla. Se recuperaron 100uL de muestra de la superficie del medio de suspensión; la motilidad y concentración fueron evaluadas.

5.6 Fertilización *in vitro*

Para la fecundación; se preparó una solución con los espermatozoides a una concentración final de $2 - 4 \times 10^6$ espermatozoides por mL diluyéndose con un volumen necesario de medio de fecundación, adicionándose 10uL/mL de heparina (20mg/mL), así como también 10 ul/mL de PHE (2mM Penicilamina, 1mM Hipotaurina y 250uM de Epinefrina). Se formaron gotas de 50 uL con la solución descrita anteriormente, donde fueron colocados de 10 -15 ovocitos por gota, se anotó la hora de la fecundación y se incubó a 38.5°C por 18h para su primera evaluación. Se formaron dos grupos, los obtenidos por aspiraciones (Grupo 1) y los obtenidos por cortes (Grupo 2)

5.7 Inyección intracitoplasmática

Los gametos previamente evaluados, ovocitos maduros y espermatozoides motiles, fueron colocados en una placa de cultivo Falcon (351006) para la inyección intracitoplasmática. Se colocó una gota de 5uL de PVP en el centro de la placa mientras que a su derecha se encontraba la gota de espermatozoides y en las otras coordenadas también se colocaron gotas de 5uL, pero de Global Total con Hepes que contenían los ovocitos a inyectar. Un espermatozoide por ovocito fue inmovilizado en la gota de PVP, cogiendo desde la cola con el objetivo que la cabeza del espermatozoide quede del lado de la punta. El cuerpo polar del ovocito fue ubicado a las 6 o 12 horas con el fin de evitar daños al núcleo, el ovocito fue sostenido mediante la pipeta holding e inyectado en el centro de la célula seguido por aspiraciones y espiraciones del citoplasma. Esta

acción mecánica podría también activar el ovocito y es suficiente para algunas especies. Un grupo de ovocitos solo fue inyectado (Grupo 1), mientras que otros fueron expuestos a un tratamiento de activación química (Grupo 2) (Figura 12)

5.8 Activación química

Los ovocitos inyectados fueron incubados en TCM suplementado con 5 μ M de ionomicina de Ca por 5 minutos, seguido por lavados para una segunda exposición en medio KSOM suplementado con 2mM de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 3 horas en atmosfera húmeda, 5% CO₂ a 38.5°C. (Conde, 2008; Ruiz, 2011)

5.9 Cultivo de embriones *in vitro*

Los presuntos cigotos fueron lavados en medio de desarrollo KSOM y posteriormente fueron trasladados a una placa de 35 x 10mm con gotas de 50uL de medio de desarrollo KSOM suplementado (10% Suero fetal bovino, 2mM Piruvato de sodio y 50ug/mL de gentamicina), de 10 a 15 ovocitos por gota. La incubación se realizó a 38.5°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 7 días.

5.10 Valoración del desarrollo embrionario

La división y desarrollo embrionario fueron evaluados los días 3, 5 y 7; utilizando un microscopio invertido a 400X de aumento para observar su morfología e identificar el estadio. Los ovocitos divididos en dos o más células se consideraron embriones. Adicionalmente, estos fueron evaluados mediante microscopia de fluorescencia utilizando el colorante Hoechst 33342 para el etiquetado de ADN y así discernir el estadio de los ovocitos: ovocito maduro, pronúcleos, embrión de dos células, embrión de 4 células, embrión de 8 células, mórula, etc. La exposición de los embriones a esta solución BFS-Hoechst fue a una concentración de 5 μ g/mL durante 15-30 minutos cubiertos de la luz. Transcurrido este tiempo fueron evaluados mediante el uso de

un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación UV y una longitud de onda de emisión de 461nm a un aumento de 250X para su clasificación. (Figura 7, Figura 13)

5.11 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados comparando ambas metodologías o grupos para la producción de embriones: FIV e ICSI. Al tratarse de datos cualitativos, se utilizó una prueba no paramétrica de Chi cuadrado y la prueba exacta de Fisher. Las diferencias entre grupos fueron consideradas significativas cuando $P > 0.05$. Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS v. 15.

6 RESULTADOS

6.1. Producción de embriones mediante FIV

La obtención de los ovocitos se realizó mediante dos métodos: aspiraciones y cortes; de 38 ovocitos maduros obtenidos por aspiraciones (Grupo 1), desarrollaron 14 (36.8%) embriones. Y de 8 ovocitos maduros (Grupo 2) obtenidos por cortes, 3 (37.5%) (Tabla 2) No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) para ambas metodologías.

Tabla 2. Embriones producidos mediante FIV

<i>Grupos</i>	N° ovocitos maduros	%Embriones
Grupo 1	38	14 (36.8%)
Grupo 2	8	3 (37.5%)

6.2. Producción de embriones mediante ICSI

De 27 ovocitos maduros inyectados, se obtuvieron 5 embriones; 16 ovocitos maduros inyectados fueron expuestos a un tratamiento de activación química (Grupo 2), mientras que los restantes solo fueron inyectados y puestos inmediatamente a medio de desarrollo (Grupo 1) (Tabla 3)

Tabla 3. Embriones producidos mediante ICSI

<i>Grupos</i>	N° ovocitos maduros inyectados	% Embriones
Grupo 1	11	0/11 (0%)
Grupo 2	16	5/16 (31.3%)

6.3. Comparación de embriones obtenidos mediante FIV e ICSI

Los embriones producidos por ambos métodos: FIV (Grupo 1 y Grupo 2), 17/46 e ICSI (Grupo 2), 5/16 son descritos en la Tabla 4, considerando el estadio de pronúcleos en adelante. Siendo 37% para FIV y 31.3% para ICSI. No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) para ambas metodologías. Mientras que la comparación de sus estadios: pronúcleos, embriones de 2 células, 4 células, 8 células y mórula; están descritos en la Tabla 5. Se tomó en cuenta el número total de ovocitos que llegaron o pasaron por ese estadio. Nótese que el estadio de desarrollo máximo fue mórula.

Tabla 4. Comparación de embriones mediante FIV e ICSI

			FECUNDACION		Total
			FECUNDA DO	NO FECUNDA DO	
METODO	FIV	Recuento	17	29	46
		% dentro de METODO	37.0%	63.0%	100.0%
	ICSI	Recuento	5	11	16
		% dentro de METODO	31.3%	68.8%	100.0%
Total		Recuento	22	40	62
		% dentro de METODO	35.5%	64.5%	100.0%

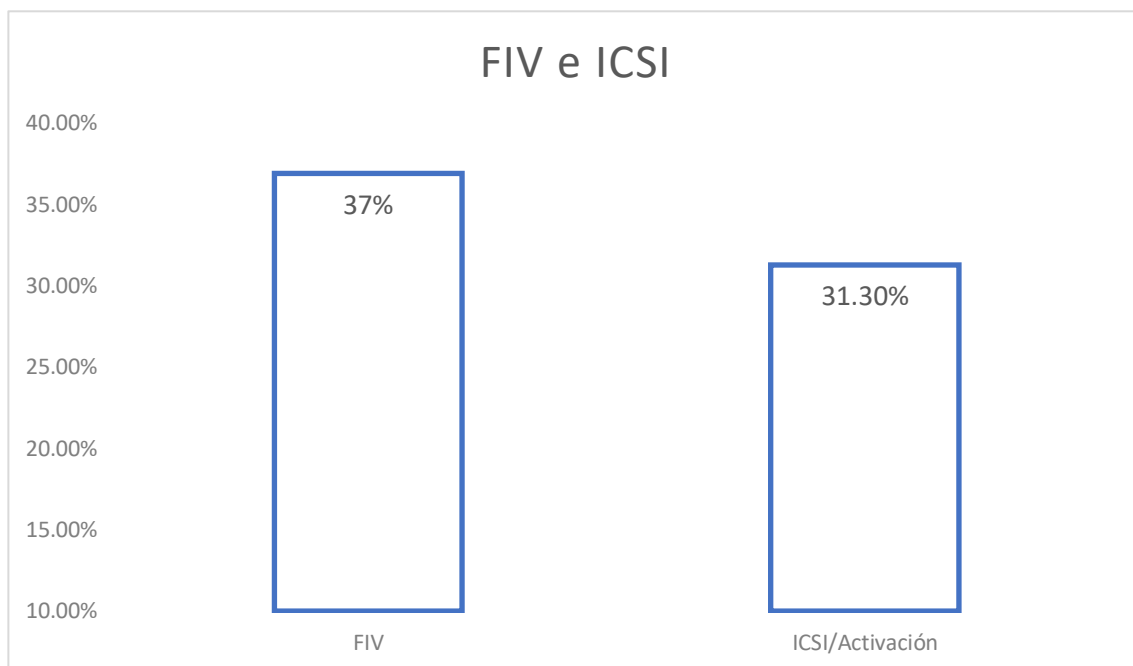


Figura 5: Comparación de la producción de embriones mediante FIV (Grupo 1 y 2) e ICSI (Grupo 2)

Tabla 5. Estadios de desarrollo en FIV e ICSI

% Estadios de desarrollo						
Grupo	N° Embriones	Fecundados /Pronúcleos	2 células (Dia 2)	4 células (Dia 3)	8 células (Dia 4)	Mórula (Dia 5)
FIV	46	17(37% ^a)	9(19.6% ^b)	7 (15.2% ^c)	3 (6.5% ^d)	2 (4.3% ^e)
ICSI/Activación	16	5 (31.3% ^a)	4 (25% ^b)	2(12.5% ^c)	2(12.5% ^d)	2(12.5% ^e)

a,b,c,d,e Superíndices iguales dentro de columnas indican que no hay diferencia significativa

(p>0.05)

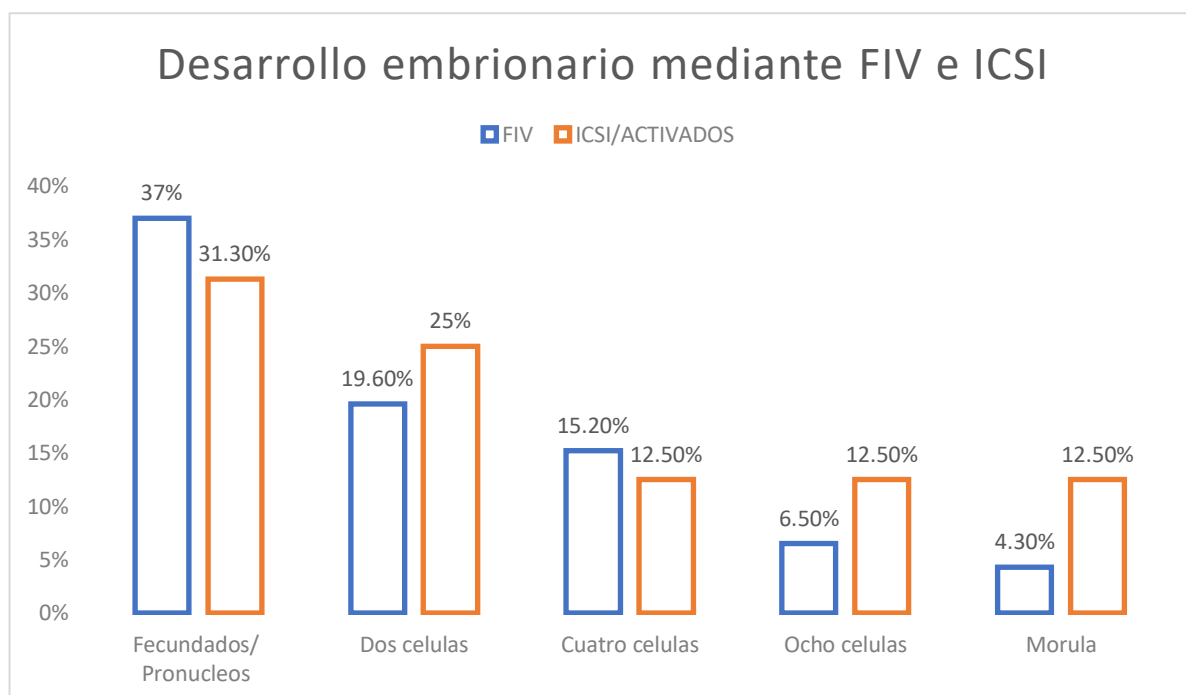


Figura 6: Estadio de desarrollo embrionario para embriones obtenidos mediante FIV e ICSI

6.3.1 Comparación de ovocitos clivados, dos células, mediante FIV e ICSI

Se comparó el número de ovocitos que fecundaron para ambos métodos, considerando el estadio de dos células en adelante. Siendo 19.6% para FIV y 25% para ICSI. No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) para ambas metodologías.

Tabla 6. Recuento de ovocitos clivados, de dos células en adelante, por ambos métodos de fecundación *in vitro*

			CLIVADOS		Total
			CLIVADOS	NO CLIVADOS	
METODO	FIV	Recuento	9	37	46
		% dentro de METODO	19.6%	80.4%	100.0%
	ICSI	Recuento	4	12	16
		% dentro de METODO	25.0%	75.0%	100.0%
Total		Recuento	13	49	62
		% dentro de METODO	21.0%	79.0%	100.0%

6.3.2 Comparación de embriones de 4 células mediante FIV e ICSI

Se comparó el número de embriones de cuatro células, obteniéndose 15.2% para FIV y 12.5% para ICSI. No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) para ambas metodologías.

Tabla 7. Recuento de embriones de 4 células por ambos métodos de fecundación in vitro

			CUATRO_CELULAS		Total
			EMBRION DE CUATRO CELULAS	NO DESARROLL O	
METODO	FIV	Recuento	7	39	46
		% dentro de METODO	15.2%	84.8%	100.0%
	ICSI	Recuento	2	14	16
		% dentro de METODO	12.5%	87.5%	100.0%
Total		Recuento	9	53	62
		% dentro de METODO	14.5%	85.5%	100.0%

6.3.3 Comparación de embriones de 8 células mediante FIV e ICSI

Se comparó el número de embriones de ocho células, obteniéndose 6.5% para FIV y 12.5% para ICSI. No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) para ambas metodologías.

Tabla 8. Recuento de embriones de 8 células por ambos métodos de fecundación in vitro

			OCHO_CELULAS		Total
			EMBRION OCHO CELULAS	NO DESARROLL ADO	
METODO	FIV	Recuento	3	43	46
		% dentro de METODO	6.5%	93.5%	100.0%
	ICSI	Recuento	2	14	16
		% dentro de METODO	12.5%	87.5%	100.0%
Total		Recuento	5	57	62
		% dentro de METODO	8.1%	91.9%	100.0%

6.3.4 Comparación de mórulas mediante FIV e ICSI

Se comparó el número de embriones en estadio de mórula, obteniéndose 4.3% para FIV y 12.5% para ICSI. No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) para ambas metodologías.

Tabla 9. Recuento de embriones en estadio de mórula por ambos métodos de fecundación *in vitro*

			MORULA		Total
			MORULA	NO DESARROLL O	
METODO	FIV	Recuento	2	44	46
		% dentro de METODO	4.3%	95.7%	100.0%
	ICSI	Recuento	2	14	16
		% dentro de METODO	12.5%	87.5%	100.0%
Total		Recuento	4	58	62
		% dentro de METODO	6.5%	93.5%	100.0%

6.3.5 Análisis de embriones por microscopía de fluorescencia

Las evaluaciones mediante microscopia de fluorescencia utilizando el colorante Hoechst 33342 permitieron discernir el estadio embrionario, como se muestra a continuación, teniendo como principal aporte identificar a los ovocitos fecundados por la presencia de los pronúcleos (Figura 7) pues estos no evidencian clivaje alguno.

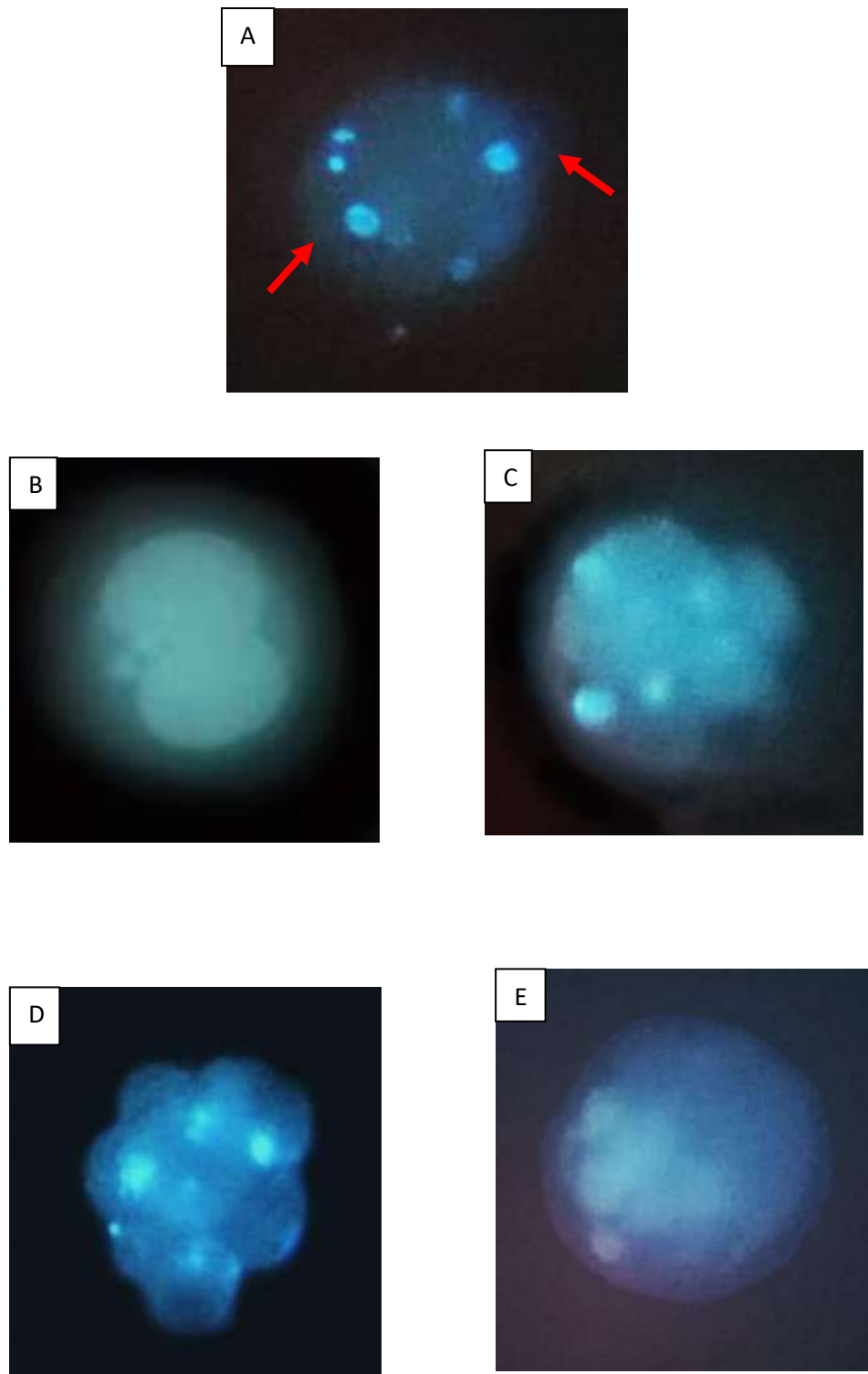


Figura 7: Análisis de embriones mediante microscopia de fluorescencia utilizando el colorante Hoechst 33342. (A) Ovocito fecundado, tinción de los pronúcleos (flechas) (B) Embrión de dos células. (C) Embrión de 4-8 células. (D) Embrión de 8-16 células. (E) Embrión en estadio de mórula.

7 DISCUSIÓN

En el presente trabajo, la fertilización *in vitro* convencional (FIV) y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) fueron empleadas para producir embriones. Ambas técnicas fueron diseñadas para solucionar problemas de infertilidad. El número de estudios que reportan la producción *in vitro* de embriones para camélidos sudamericanos es limitado. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la producción de embriones pre implantacionales de *Vicugna pacos*, alpaca.

Las tasas de fecundación obtenidas fueron de 37% (17/46) y 31.3% (5/16) para FIV e ICSI, respectivamente. Estos valores no presentan diferencias significativas ($p>0.05$) como lo muestra la Tabla 4. Estudios en la producción de embriones de *Camelus dromedarius* reportan una tasa de clivaje de 21.2% para fecundación *in vitro* utilizando espermatozoides epididimarios, y una tasa de clivaje de 23% para la metodología ICSI (El-Sayed et al., 2015) comparables con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Los ovocitos obtenidos mediante cortes o aspiraciones fueron fertilizados *in vitro*, se obtuvieron 17 ovocitos fecundados de 46 ovocitos maduros. (Tabla 2). Los ovocitos inyectados (ICSI) fueron en total 27, divididos en dos grupos; uno de ellos fue llevado a cultivo inmediatamente después de la inyección intracitoplasmática en donde no se obtuvo ningún embrión (0/11), mientras que, en el segundo grupo, el cual fue expuesto a una activación química, se obtuvieron 5 embriones (5/16), es decir 31.3%. (Tabla 3)

El daño a nivel de membrana del espermatozoide después de ICSI ha mostrado relación con el tiempo de inicio de las oscilaciones de calcio, activación del ovocito y formación de pronúcleos. (Kasai T. et al., 1999; Morozumi K. et al., 2006) Por otro lado, la inyección completa del espermatozoide, incluyendo la membrana plasmática, así como el acrosoma, previene la des condensación y la formación del pronúcleo masculino (Garcia-Rosello E et al., 2006)

Durante la fecundación, el espermatozoide dirige una serie de oscilaciones de calcio en las membranas internas del retículo endoplasmático y mitocondria pudiendo durar por horas (Carroll and Swann *et al.*, 1992; Kline y Kline, 1992; Miyazaki *et al.*, 1993). Son estas oscilaciones los responsables de una cascada de eventos como la reacción de los gránulos corticales (Miyazaki *et al.*, 1990), la reacción de la zona pelúcida (Yanagimachi *et al.*, 1994) y el escape del arresto de metafase II (Whitaker e Irvine *et al.*, 1984).

Los protocolos de activación química son experimentales para cada especie siendo referentes para este trabajo aquellos desarrollados en especie cercanas como otros camélidos sudamericanos y camélidos del viejo continente. El empleo de ionomicina/DMAP como activador químico ha reportado éxito en camélidos, Sansinema *et al.* (2007) reportaron un incremento en el número de embriones de llama del 34% utilizando este tratamiento post ICSI, Wani *et al.* (2018) por su parte trabajando en camello demostraron la eficiencia del uso concomitante de estos compuestos en la obtención de embriones partenogénéticos respecto a otros activadores.

En este estudio, la inyección seguida de la activación química de ovocitos promovió el desarrollo de embriones de alpaca. No se obtuvieron embriones más que en el grupo en el que se activaron los ovocitos post inyección intracitoplasmática (31.3%). Por otro lado, se observa que en llamas existen datos sobre diferentes técnicas de activación, mediante solo ICSI se encontraron 29% (4/14), mientras que los activados con ionomicina y DMAP fueron 63% (15/24) (Sansinema *et al.*, 2007) Lo cual tiene correlación con los resultados encontrados.

Las condiciones de cultivo en ambos métodos fue el mismo: 38.5°C de temperatura, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa; se sabe que si las condiciones se asemejan más al microambiente natural del útero esto podría verse reflejado positivamente en el número de embriones que se desarrolle. Por ejemplo, en este trabajo se controló el porcentaje de CO₂ mas no de los otros gases como el nitrógeno o el oxígeno. Siendo baja la tensión de oxígeno en el tracto reproductor

femenino, se han reportado casos en donde se muestra un mayor éxito en los resultados cuando la tensión de oxígeno es de 5% o 10% durante el cultivo embrionario. (Harvey et al., 2007; Ieys et al., 2017)

En el presente trabajo no se observó embrión alguno que llegase al estadio de blastocisto (Tabla 5, Figura 6), estudios previos relacionan la producción de blastocisto con el efecto de la tensión del oxígeno (Harvey et al., 2007), así como el uso de diferentes células somáticas durante el cultivo. Por otro lado, la baja tensión del oxígeno podría tener relación o ser beneficioso cuando se cultivan ovocitos individualmente mas no es grupo con las células del cumulus (Goovaerts et al., 2012; Correa G. et al. 2008)

El número de ovocitos fecundados, así como el de embriones clivados, no presentan diferencias significativas ($p>0.05$) para ambos métodos (Tabla 6) Al igual que el análisis realizado en comparación de los estadios de 4 células, 8 células y mórulas. Sin embargo, cabe señalar que un mayor número de embriones llegaron a estadios más avanzados como mórula (12.5%) en el grupo fecundado mediante ICSI/ Activación en comparación con los obtenidos mediante FIV (4.3%). Para corroborar el estadio de cada embrión, utilizamos la microscopía de fluorescencia como prueba de presencia de núcleos y la posterior clasificación de embriones por sus clivajes y estadios (Figura 10), así como lo reportan otros autores (Conde *et al.*, 2008)

Los protocolos propuestos por la literatura indican que tanto los medios utilizados como las condiciones de cultivo para este procedimiento son de vital importancia para su éxito. La calidad de la muestra y el tratamiento desde la colecta hasta su llegada al área de trabajo, son cruciales para la maduración de los gametos, así como para la fecundación, principalmente si proceden de un camal (Klumpp, 2004; Arriaga *et al.*, 2014). Es decir, los largos periodos de almacenamiento, así como la temperatura de transporte son relevantes como lo reportan diversos estudios en los que la calidad, número y desarrollo de embriones están relacionados. (Ratto, *et al.*, 2005; Chileno & Cainzo, 2014; Chuquitaype, 2015; Ruiz, *et al.*, 2017 y Torres, 2017)

Las muestras utilizadas llegaron de 22 a 24 horas posteriores al sacrificio del animal, a 4°C (Condiciones de traslado). Trabajos en bovinos han demostrado que el daño al ovocito, como lesiones en el huso y endurecimiento de la zona pelúcida (Włodarczyk *et al.*, 2009), es posible debido a que la membrana lipídica sufre cambios a temperaturas menores de 20°C (Arab *et al.*, 1996). Sin embargo, estos análisis lipídicos no han sido evaluados en alpacas.

Siendo 33 horas el tiempo promedio de maduración empleado para este trabajo, estudios realizados en especies como llamas o dromedarios indican que el tiempo de maduración está en el rango de 32 a 44 horas (Abdoon *et al.*, 2001; Wani *et al.*, 2005) teniendo en cuenta una temperatura de traslado de 37°C y no mayor a 12 horas, pero también se sabe que el rendimiento de ovocitos envejecidos es menor en relación a la fecundación y desarrollo embrionario pues hay probabilidad de daño en los gránulos corticales y microtúbulos (Long *et al.*, 1994; Hunter *et al.*, 1989). Estas observaciones recaen sobre la calidad de los gametos obtenidos, lo que indicaría que la capacidad de los ovocitos para alcanzar un estado óptimo puede estar sujeta a la influencia de diversos factores: tiempo y temperatura de traslado (Arriaga *et al.*, 2014).

8 CONCLUSIONES

- Este trabajo demostró que es posible la producción de embriones pre implantacionales de alpaca utilizando tanto la técnica de FIV como la de ICSI, pero que el porcentaje de éxito para ambos métodos no presenta diferencia significativa ($p>0.05$)
- La activación química del ovocito es un paso fundamental para la fecundación cuando se realiza la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI)
- El porcentaje en la producción de embriones respecto a ovocitos recuperados mediante aspiraciones o cortes no presenta diferencias significativas ($p>0.05$)

9 RECOMENDACIONES

- Mayores estudios respecto al tiempo de maduración de ovocitos pues el óptimo para esta especie está en el rango de 32 y 44 horas, siendo también las condiciones de traslado un limitante en el desarrollo embrionario y maduración citoplasmática y nuclear.
- Utilizar ambos métodos de aislamiento (aspiración y cortes) para aprovechar y aumentar el número complejos- cumulus oophorus de las categorías I y II.
- Mejorar el sistema para el transporte de las muestras biológicas (ovarios y testículos) pues el tiempo y temperatura son cualidades limitantes para su posterior rendimiento.
- Estandarizar los métodos de activación pues es un protocolo variable en diferentes especies.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams GP, Sumar J, Ginther OJ. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). J. Reprod. Fert. 90, 535–545.
- Anguita, B., Paramio, M. T., Morato, R., Romaguera, R., Jimenez-Macedo, A. R., Mogas, T., & Izquierdo, D. (2009). Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. Animal reproduction science, 116(1-2), 95-106.
- Araújo, V. R., Gastal, M. O., Figueiredo, J. R., & Gastal, E. L. (2014). *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. Reproductive biology and endocrinology, 12(1), 78.
- Arav, A., Zeron, Y., Leslie, S. B., Behboodi, E., Anderson, G. B., & Crowe, J. H. (1996). Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. Cryobiology, 33(6), 589-599.
- Arriaga, I., Huanca, W., Terreros, M., Becerra, J. J., García, P., & Ampuero, A. (2014). Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División in vitro de Ovocitos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4), 477-486.
- Béjar, J. R. Estado de la producción de embriones *in vitro* en camélidos sudamericanos. (2015)
- Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Animal Reproduction Science 2000; 62: 173–93.
- Bravo W, Alarcon V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. 2013. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. Animal Reproduction Science 136 (2013)157-163.
- Bravo, P. W., & Varela, M. H. (1993). Prenatal development of the alpaca (*Lama pacos*). Animal Reproduction Science, 32(3-4), 245-252.

- Brown, B. W. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal reproduction science*, 58(3-4), 169-195.
- Catt, S. L., Catt, J. W., Gomez, M. C., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (1996). Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Veterinary Record*, 139(20), 494-495.
- CENAGRO, I. (2012). IV Censo Nacional Agropecuario. *Resultados finales*. INEI Lima Perú.
- Cochran, R., Meintjes, M., Reggio, B., Hylan, D., Carter, J., Pinto, C., Godke, R. A. (1998). Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science*, 18(11), 736-740.
- Conde, P. A., Herrera, C., Trasorras, V. L., Giuliano, S. M., Director, A., Miragaya, M. H., Chaves, M. G., Sarchi, M. I., Stivale, D., Quintans, C., Agüero, A. (2008). *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by IVF and ICSI with fresh semen. *Animal reproduction science*, 109 (1), 298-308.
- Contreras, M., Olaguivel, C., & Naveros, M. L. Evaluación de la calidad de embriones producidos por fertilización *in vitro* en alpacas (*Vicugna pacos*). XXXVII Reunión científica anual de la asociación peruana de producción animal, 248.
- Correa, G. A., Rumpf, R., Mundim, T. C. D., Franco, M. M., & Dode, M. A. N. (2008). Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal reproduction science*, 104(2-4), 132-142.
- De Armas, M. R. Posibilidades de la Biotecnología Animal como herramienta para el mejoramiento ganadero y su estado actual en Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Panamá. Chiriquí, República de Panamá.
- El-Sayed, A., Ashour, G., Kamel, A. M., & El-Bahrawy, K. A. (2015). Assessment of embryo production of Dromedary (*Camelus dromedarius*) using two semen sources and two in vitro fertilization techniques. *Egypt. J. Anim. Prod*, 52, 153-160.

- Fernández Baca, S. (1971). La alpaca: reproducción y crianza. Boletín de divulgación, 9(7).
- Fernández Baca, S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Gandarillas, D. Caracterización de la fibra de alpacas de la raza huacaya en las comunidades alpaqueras de Tacna. *RCS*, 19.
- Garcia-Rosello E, Matas C, Canovas S, Moreira PN, Gadea J, Coy P. Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *J Androl* 2006; 27:268–75.
- Gómez C, Ratto MH, Berland M, Wolter M, Adams GP. 2000. Super stimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology* 57: p584.
- Goovaerts, I. G. F., Leroy, J. L. M. R., Langbeen, A., Jorssen, E. P. A., Bosmans, E., & Bols, P. E. J. (2012). Unravelling the needs of singly in vitro-produced bovine embryos: from cumulus cell co-culture to semi-defined, oil-free culture conditions. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(8), 1084-1092.
- Hamano, K. I., Li, X., Qian, X. Q., Funauchi, K., Furudate, M., & Minato, Y. (1999). Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biology of Reproduction*, 60(5), 1194-1197.
- Huanca, T., Gonzales, M., Mamani, R. H., Naveros, M., & Huanca, W. a SPRA SPERMOVA (2012)
- Huanca, T., Gonzáles, M., Mamani-Cato, R. H., Cárdenas, O., Sapana, R., & Naveros, M. (2014).

- Iews, M., Hashem, A., AbdelHafez, F., Abdelkareem, A., Peng, B., & Bedaiwy, M. (2017). Oxygen tension influences mouse embryo development when varies in concentration. *Fertility And Sterility*, 108(3), e163.
- ILLPA–INIA–Puno, C. E. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas.
- INIA: Avances en la transferencia de embriones de camélidos domésticos. Mem XXXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Abancay: APPA. p, 31-34.
- Kadwell, M., Fernandez, M., Stanley, H. F., Baldi, R., Wheeler, J. C., Rosadio, R., & Bruford, M. W. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1485), 2575-2584
- Kasai T, Hoshi K, Yanagimachi R. Effect of sperm immobilisation and demembration on the oocyte activation rate in the mouse. *Zygote* 1999; 7:187– 93.
- Leisinger, C. A., Coffman, E. A., da Silva, M. C., Forshey, B. S., & Pinto, C. R. F. (2014). Factors affecting *in vitro* maturation of alpaca (*Lama paco*) oocytes. *Animal reproduction science*, 150(1-2), 70-75.
- Mamani Mango, Guiulfo D. Métodos de selección espermática y tasa de fecundación *in vitro* en ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). 2015. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Mancisidor Solorzano, I. B. (2013). Efecto del α -tocoferol durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*).
- Marqués, M. G., Nicacio, A. C., de Oliveira, V. P., Nascimento, A. B., Caetano, H. V. A., Mendes, C. M., Visintin, J. A. (2007). In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Animal reproduction science*, 97(3-4), 375-381

- Miragaya, M. H., Chaves, M. G., & Agüero, A. (2006). Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*, 61(2-3), 299-310.
- Morozumi K, Shikano T, Miyazaki S, Yanagimachi R. Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17661–6.
- Morton, Katherine M.; Roslyn Bathgate; Gareth Evans; W. M. Chis Maxwell. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 792–796.
- Paredes, M. M., Membrillo, A., Azor, P. J., Machaca, J. E., Torres, D., & Serrano, A. M. (2013). Genetic and phenotypic variation in five populations of Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Small ruminant research*, 111(1-3), 31-40.
- Pariona, C., & Milagro, N. (2009). Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*).
- Ruiz, B., Landeo, J., Artica, F., Ratto, F., & Correa, S. (2011). Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(3), 206-212.
- Ruiz, J., Santayana, R. P., Mendoza, M. J., Landeo, J. L., Huamán, E., Ticllacuri, F., Mujica, L. F., Silva M. & Ratto, M. H. (2017). Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology*, 95, 127-132.
- Sansinena, M. J., Taylor, S. A., Taylor, P. J., Schmidt, E. E., Denniston, R. S., & Godke, R. A. (2007). *In vitro* production of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: effect of chemical activation treatments and culture conditions. *Animal reproduction science*, 99(3), 342-353.

- Vallejo, J., Gómez-Piquer, V., & Tarín, J. J. (2003). Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. *Rev Iberoam Fertil Reprod Hum*, 20, 177-187.
- Van Woudenberg, A. B., Gröllers-Mulderij, M., Snel, C., Jeurissen, N., Stierum, R., & Wolterbeek, A. (2012). The bovine oocyte *in vitro* maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. *Reproductive Toxicology*, 34(2), 251-260.
- Wani, N. A., & Nowshari, M. A. (2005). Kinetics of nuclear maturation and effect of holding ovaries at room temperature on *in vitro* maturation of camel (*Camelus dromedarius*) oocytes. *Theriogenology*, 64(1), 75-85.
- Wani, N. A., Vettical, B. S., & Hong, S. B. (2017). First cloned Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) calf produced by interspecies somatic cell nuclear transfer: A step towards preserving the critically endangered wild Bactrian camels. *PloS one*, 12(5).
- Wigglesworth, K., Lee, K. B., O'Brien, M. J., Peng, J., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2013). Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Włodarczyk, R., Bukowska, D., Jackowska, M., Mucha, S., & Jaskowski, J. M. (2009). *In vitro* maturation and degeneration of domestic cat oocytes collected from ovaries stored at various temperatures. *Veterinarni Medicina*, 54(10), 491-497.
- Yalta M., C. E. (2014). Variabilidad genética poblacional de alpacas *Vicugna pacos* determinada por marcadores microsatélites en el Centro Piloto Munay Paqocha y del Fundo Itita, Puno-Perú.
- Yanagida K, Kimura Y, Katayose H, Yazawa H, Konnai K, Sato A. Fertilization using male germ line-cells. *Hum Cell* 1997;10:255–62.
- Yang, Z. Y., & Chian, R. C. (2017). Development of *in vitro* maturation techniques for clinical applications. *Fertility and sterility*, 108(4), 577-584.

- Yoon, K. W., Shin, T. Y., Park, J. I., Roh, S., Lim, J. M., Lee, B. C., Hwang, Lee, E. S. (2000). Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(4), 133-139.
- Yoshino, O., McMahon, H. E., Sharma, S., & Shimasaki, S. (2006). A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28).

11 ANEXOS



Figura 08: Camal de la ciudad de Huancavelica, Perú



Figura 09: Ovarios lavados con agua corriente (Arriba - Izquierda), ovarios en BFS (Arriba - Derecha), aspiración de un folículo (Abajo)

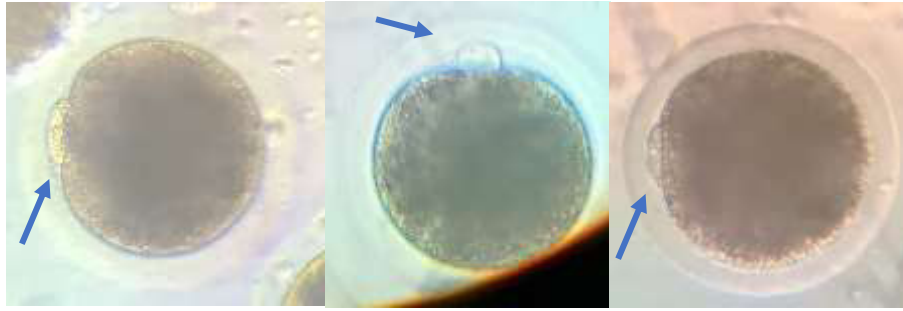


Figura 10: Ovocitos maduros, las flechas señalan el 1º cuerpo polar



Figura 11: Zona caudal del epidídimo

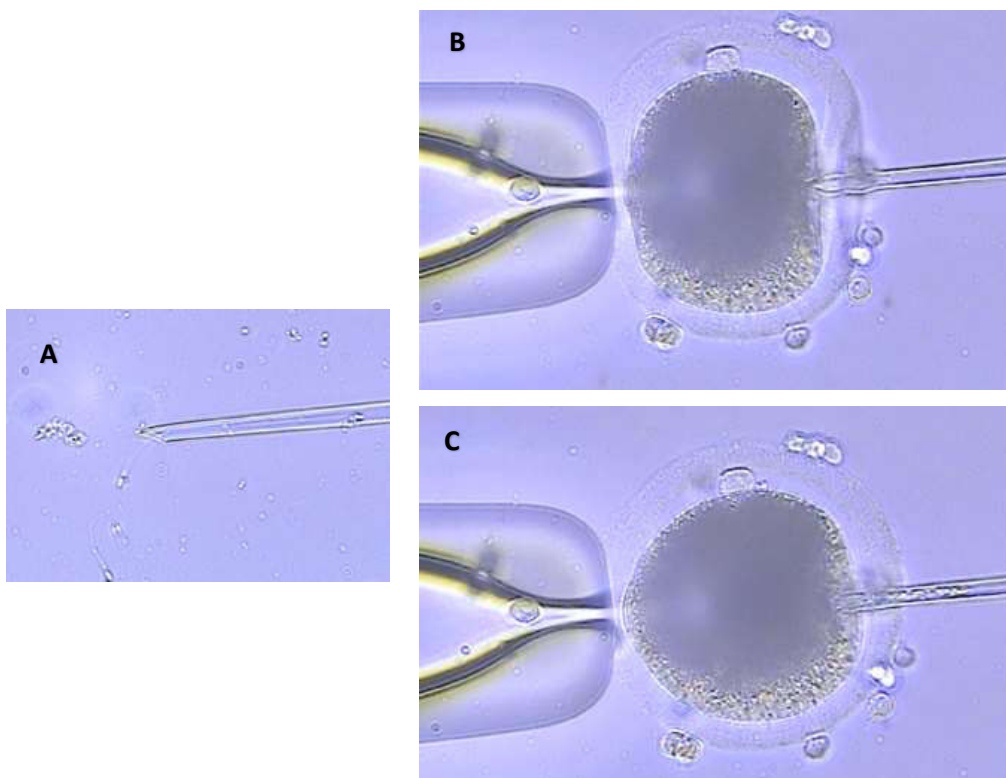


Figura 12: Aspiración de un espermatozoide para ICSI (A), Inyección del ovocito, se muestra el cuerpo polar a las 12 en punto (B), aspiraciones y espiraciones del citoplasma (C).

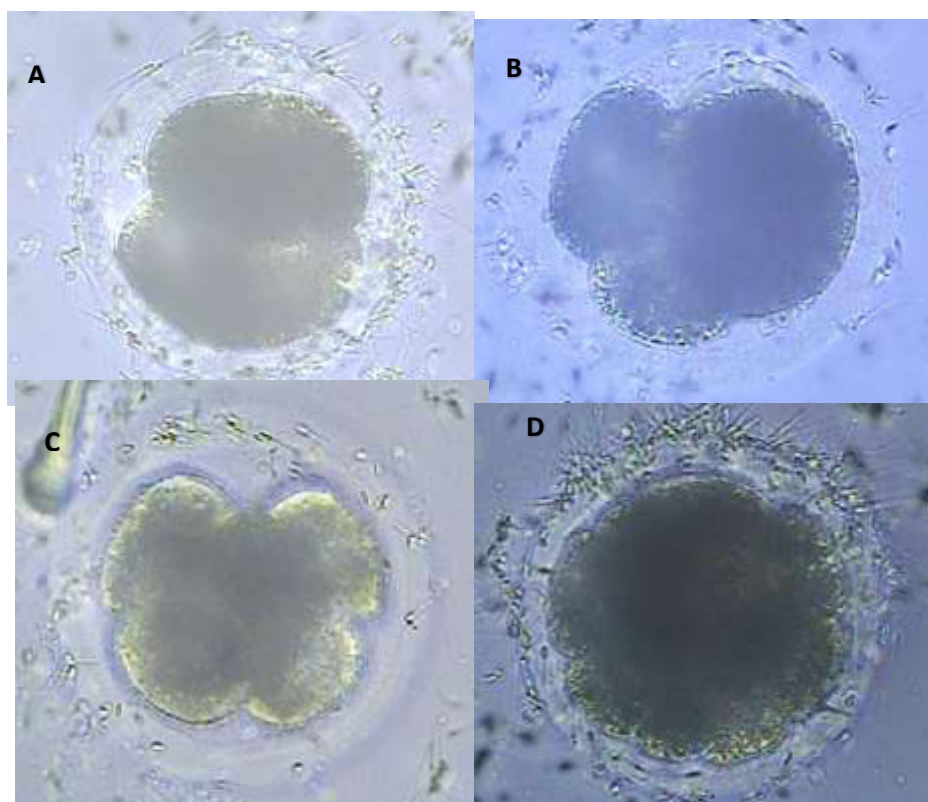


Figura 13. Estadios de desarrollo embrionario a campo claro 250X.
Embrión de dos células (A), Embrión de 4 células (B), Embrión de 8 células (C) y mórula (D)

	12/09/2018	26/09/2018		27/09/2018		3/10/2018	
	Aspirados	Aspirados	Cortes	Aspirados	Cortes	Aspirados	Cortes
Ovocitos en FIV	29	24	22	28	24	71	19
# de ovocitos maduros	11	10	2	0	2	2	0
2dp CP	0	1	0	0	0	0	0
Pronúcleos	0	1	1	0	0	0	0
2 células	2	0	1	0	0	0	0
4 células	3	1	0	0	0	0	0
8 células	0	0	0	0	0	0	0
Mórula	1	0	0	0	0	0	0
% producción de embriones	54%	30%	100%	-	0%	0%	-

	10/10/2018		11/10/2018		17/10/2018		24/10/2018		8/11/2018
	Aspirados	Cortes	Aspirados	Cortes	Aspirados	Cortes	Aspirados	Cortes	aspirado
Ovocitos en FIV	21		20	10	31	22	28	29	
# de ovocitos maduros	4	0	1	2	4	0	1	2	5
2dp CP	0		0	0	0	0	0	0	
Pronúcleos	2		0	1	2	0	0	0	
2 células	0		0	0	0	0	0	0	
4 células	0		0	0	0	0	0	0	
8 células	0		0	0	0	0	0	0	1
Mórula	1		0	0	0	0	0	0	
% producción de embriones	75%		0%	50%	50%	-	0%	0%	20%

Figura 14: Número de ovocitos fertilizados en relación a número de ovocitos maduros y embriones producidos mediante FIV

	28/11/2018	5/12/2018	
	Aspirados	Aspirados	Cortes
Ovocitos en ICSI	5	6	5
# de ovocitos maduros			
2dp CP			
Pronúcleos	1		
2 células	1	1	
4 células			
8 células			
Mórula	2		
% producción de embriones	80%	17%	

Figura 15: Número de ovocitos fertilizados en relación a número de ovocitos maduros y embriones producidos mediante ICSI